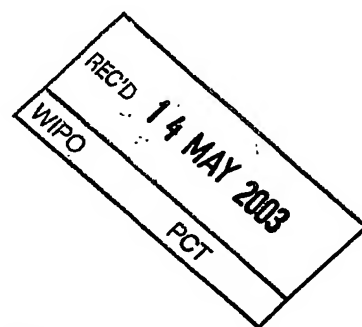


# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 102 15 123.7

**Anmeldetag:** 5. April 2002

**Anmelder/Inhaber:** Klaus Cichutek, Langen in Hessen/DE;  
Michael Mühlebach, Schöneck, Hess/DE;  
Matthias Schweizer,  
Freiburg im Breisgau/DE.

**Bezeichnung:** Von SIVsmmPBj14 abgeleitete lentivirale  
Vektoren, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre  
Verwendung zur Genübertragung in Säugerzellen

**IPC:** C 12 N 15/867

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der  
ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 9. April 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Eberl

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1 (a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

**Von SIVsmmPBj14 abgeleitete lentivirale Vektoren, Verfahren zu ihrer  
Herstellung und ihre Verwendung zur Genübertragung in Säugerzellen**

10

Der Ausdruck "lentivirale Vektoren" oder "SIVsmmPBj-Vektoren" bezeichnet infektiöse, aber vermehrungsunfähige Retroviren, die Gene in Form von retroviralen Expressionsvektoren (auch Expressionskonstrukte oder verpackbare Konstrukte genannt) in Zellen einschleusen können. Als Lentiviren wird eine Gruppe der *Retroviridae* bezeichnet, die nach Infektion des Menschen, anderer Primaten und Säuger (z.B. Schafe, Katzen) nach langer Inkubationszeit zur Krankheit führt. Eine allgemeine Übersicht über retrovirale bzw. lentivirale Vektoren findet sich beispielsweise in Miller AD (1997) Development and applications of retroviral vectors. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, Vigna E. und Naldini L. (2000) *J. Gen. Med.* 2:308 und Palu G. et al. (2000) *Rev. Med.*  
20 *Virol.* 10:185. Der Gentransfer mit retroviralen bzw. lentiviralen Vektoren wird auch als Transduktion bezeichnet. Die Genübertragung führt zur Integration des Expressionsvektors in das Genom der Zelle. Expressionsvektoren beinhalten ein Verpackungssignal *psi*, welches zur Inkorporation der RNA des Expressionsvektors in die Vektorpartikel und zur Genübertragung führt. Als "psi" wird also das Verpackungssignal der Retroviren bezeichnet, das die effiziente Verpackung der Boten-RNA des Expressionsvektors steuert. Der Expressionsvektor muß zudem von lentiviralen LTR-Sequenzen („Long Terminal Repeats“) flankiert sein, damit die korrekte Umschreibung der RNA des Expressionsvektors in DNA und die nachfolgende Integration des Expressionvektorgens in die chromosomale DNA der Zelle erfolgt. Der retrovirale Gentransfer ist vorteilhaft, weil (i) in der Regel eine Kopie des gewünschten Gens  
30 in Zellen überführt wird, (ii) das Gen im allgemeinen ohne Mutationen oder Umlagerungen transferiert wird, und (iii) ein stabiler chromosomaler Einbau erfolgt.

Der Tropismus der lentiviralen Vektoren, d. h. die Auswahl der Säugerzellen, in welche diese das Expressionkonstrukt überführen können, wird durch das *env*-Gen in der benutzten  
35 Verpackungszelle und damit durch die *env*-Genprodukte in den Vektorpartikeln bestimmt. Das *env*-Gen verschiedener Retroviren, z.B. des murinen Leukämievirus (MLV),

verschiedener Lentiviren wie HIV, SIV oder FIV („Felines Immundefizienzvirus), aber auch von EIAV („Equine Infectious Anemia Virus“) oder CIAV („Caprine Infectious Anemia Virus“), das zur Bildung lentiviraler Vektorpartikel eingesetzt wird, wird in Hüllproteine, das Transmembranprotein (TM) und das Oberflächenhüllprotein (SU), übersetzt, welche die äußere Hülle des lentiviralen Vektors bilden. Die *env*-Genprodukte des amphotropen MLV, des GaLV („Gibbon Ape Leukemia Virus“) und das G-Protein des VSV („Vesicular Stomatitis Virus“; Burns et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8033) werden bisher vor allem benutzt. Sie erlauben den Gentransfer in eine große Anzahl unterschiedlicher Säugerzellen, auch in humane Zellen. Speziell für den selektiven Gentransfer in humane Zellen eines bestimmten Zelltyps, z.B. T-Zellen oder hämatopoetische Stammzellen, sind die *env*-Genprodukte des ecotropen, des amphotropen MLV oder des Milznekrosevirus (SNV; „Spleen Necrosis Virus“) geeignet, wenn sie durch Einbau von Domänen einzelkettiger Antikörper (scFv; „single chain Fv“) oder anderer Liganden für Zelloberflächenproteine wie z.B. der Zytokine oder Wachstumsfaktoren modifiziert wurden.

Während von C-Typ-Retroviren abgeleitete Vektoren Fremdgene nur in mitotisch aktive Zellen übertragen können, sind lentivirale Vektoren in der Lage, sowohl aktiv proliferierende als nicht proliferierende Zellen zu transduzieren. Dies hat den Vorteil, daß Leberzellen, verschiedene Hirnzelltypen, T-Zellen und andere, in vivo nicht unbedingt proliferationsaktive Zellen auch ohne mitotische Stimulierung transduziert werden können. Allerdings sind alle bisher bekannten, von Lentiviren abgeleitete Vektoren nur für solche nicht proliferierenden Zellen geeignet, die sich in einem bestimmten Aktivierungszustand, nämlich in der G1-Phase des Zellzyklus, befinden. Zellen in der G0-Phase wie z.B. viele Stammzellen sind zwar potentielle Zielzellen in vielen Gentherapiestrategien, können bisher jedoch nicht mit retroviralen oder lentiviralen Vektoren transduziert werden.

Im Gegensatz zu allen anderen Lentiviren ist SIVsmmPBj14, ein Immundefizienzvirus der Schopfmangabe (Fultz PN et al. (1989) *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 5:397) in der Lage, auch in nicht-stimulierten primären humanen Lymphozyten, die sich in der G0-Phase befinden, zu replizieren. Diese Eigenschaft korreliert mit einer hohen Pathogenität: SIVsmmPBj14 verursacht nach Inter-Spezies-Übertragung in Schweinsaffen eine heftige akute Erkrankung, die oft nach 7-10 Tagen zum Tode führt. Obwohl verschiedene Abweichungen der SIVsmmPBj14-Sequenz gegenüber der des nicht-pathogenen Elternstamms SIVsmm9 gefunden wurden (u.a. in der LTR, dem *env*- und dem *nef*-Gen),

konnten die viralen Faktoren, die diese besonderen Eigenschaften bestimmen, noch nicht eindeutig identifiziert werden.

Es ist daher die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, retrovirale Vektoren, die Zellen in der G0-Phase transduzieren können und Verfahren zu ihrer Herstellung bereitzustellen. Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch den Gegenstand der Patentansprüche gelöst.

Erfindungsgemäß wurde gezeigt, dass die Eigenschaft von SIVsmmPBj14, ruhende Lymphozyten in der G0-Phase infizieren zu können, auf nicht-replikationsfähige, von SIVsmmPBj14 abgeleitete Vektoren übertragen werden kann. Ferner wurde gezeigt, dass diese Eigenschaft nicht vom env-Gen von SIVsmmPBj14 abhängig ist und dieses daher nicht im Vektorsystem vorhanden sein muss. Das eröffnet die Möglichkeit, Gene in Zellen zu übertragen, die sich in der G0-Phase des Zellzyklus befinden.

Die Erfindung betrifft einen retroviralen Vektor, der zur Transduktion von Zellen in der G0-Phase fähig ist, wobei der Vektor von SIVsmmPBj14 abgeleitet ist. Vorzugsweise ist der retrovirale Vektor auch zur Transduktion von Zellen in der mitotischen und/oder in der G1-Phase fähig. Der erfindungsgemäße retrovirale Vektor weist vorzugsweise eine Deletion eines Teils oder des gesamten env-Gens von SIVsmmPBj14 auf, wodurch in einer besonders bevorzugten Ausführungsform das env-Oberflächenhüllprotein nicht mehr funktionsfähig ist. Die Deletion liegt in einer Ausführungsform im SU-Bereich des env-Gens vor. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform liegt der erfindungsgemäße Vektor als Pseudotypvektor vor und umfasst vorzugsweise einen Teil oder das gesamte Hüllprotein eines zu SIVsmmPBj14 unterschiedlichen Virus, insbesondere eines Retrovirus. In bestimmten Ausführungsformen ist das zu SIVsmmPBj14 unterschiedliche Virus aus HIV-1, SIVagm, SNV, MLV oder VSV ausgewählt und in einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Hüllprotein eines zu SIVsmmPBj14 unterschiedlichen Virus das G-Protein von VSV.

Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Pseudotypvektoren, umfassend die Schritte: a) Deletieren eines Teils oder des gesamten env-Gens von SIVsmmPBj14 oder eines davon abgeleiteten Moleklarklons wie SIVsmmPBj1.9 und b) Kotransfektion von Zellen mit dem in a) erhaltenen Konstrukt und einem Expressionskonstrukt für ein Hüllprotein eines zu SIVsmmPBj14 unterschiedlichen Virus. Vorzugsweise liegt die Deletion im SU-Bereich des env-Gens vor und das env-

Oberflächenhüllprotein ist durch die Deletion nicht mehr funktionsfähig. In einer Ausführungsform sind die kotransfizierten Zellen 293T-Zellen. In bestimmten Ausführungsformen ist das zu SIVsmmPBj14 unterschiedliche Virus aus einem Retrovirus ausgewählt. In bestimmten Ausführungsformen ist das zu SIVsmmPBj14 unterschiedliche Virus aus HIV-1, SIVagm, SNV, MLV oder VSV ausgewählt und in einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Hüllprotein eines zu SIVsmmPBj14 unterschiedlichen Virus das G-Protein von VSV.

Des weiteren betrifft die Erfindung nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältliche Pseudotypvektoren.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Vektors zur Transduktion von Zellen in der G0-Phase, insbesondere zur Gentherapie. Die Zellen können aktiviert oder nicht aktiviert sein. Die zu transduzierenden Zellen sind vorzugsweise Säugerzellen, insbesondere humane Zellen. In einer Ausführungsform sind die zu transduzierenden Zellen humane Lymphozyten.

Der hier verwendete Begriff retroviraler Vektor bedeutet ein replikationsdefizientes retrovirales Viruspartikel, das anstelle der retroviralen mRNA eine fremde eingeführte RNA eines Gens, z. B. eines therapeutischen Gens oder dessen Fragment oder eines Reportergens übertragen kann. Der hier verwendete Begriff „therapeutisches Gen“ bedeutet eine Nukleinsäuresequenz, die in die Zielzelle mittels des retroviralen Vektors eingeführt werden soll und umfasst komplette Gene, deren Fragmente, Antisense-Nukleinsäuren und dergleichen.

Der hier verwendete Begriff pseudotypisiert bedeutet, dass der retrovirale Vektor einen Viruskern eines Retrovirus besitzt und die Virushülle von einem anderen Retrovirus stammt.

#### Abbildungen:

Abb.1 zeigt Konstrukte zur Herstellung von [SIVsmmPBj(VSV-G)] Pseudotypvektoren.

A) Genomstruktur von SIVsmmPBj-wt

Die BstZ171-Schnittstellen (bzw. des Isoschizomers Bst11071) zur Einführung der nef-Deletion in pPBjΔenv sind eingezeichnet.

B) Restriktionskarte von pPBjΔenv.

C) Das VSV-G-Expressionskonstrukt pMD.G.

Abb. 2 zeigt einen Vergleich der Effizienz verschiedener Vektoren zur Transduktion arretierter Zellen. Verhältnis der Transduktionstiter der Vektoren auf den arretierten Zellen zu den Transduktionstitem auf proliferierenden Zellen auf Basis der in Tab. 1 angegebenen Daten. Dargestellt sind die Mittelwerte aller Messungen und deren Standardabweichungen (Fehlerbalken).

Die nachstehenden Beispiele, die der Erläuterung dienen, sind nicht begrenzend für den Umfang der Erfindung zu verstehen.

### Beispiele

#### Beispiel 1: Konstruktion eines von SIVsmmPBj14 abgeleiteten lentiviralen Pseudotypvektors der ersten Generation

Das env-Gen des von SIVsmmPBj14 gewonnenen infektiösen Moleklarklons SIVsmmPBj1.9 (Dewhurst S. et al. (1990) *Nature* 345:636) wurde durch eine Deletion inaktiviert. SIVsmmPBj1.9 wurde mit BstZ17I verdaut, das an den Positionen 6461 und 7577 schneidet, die beide im SU-Bereich von env liegen. Nach Entfernung des 1116 bp-Fragments und Re-ligation wurde das Konstrukt pPBjΔenv erhalten (Abb. 1), das für das komplette SIVsmmPBj1.9 kodiert, wobei das env-SU durch Deletion von 1116 Basen nicht mehr funktionsfähig ist. Durch diese Deletion werden weder andere Gene (tat, nef etc.), noch bekannte Spleiß-Stellen oder das Rev Responsive Element (RRE) betroffen.

Danach wurden durch Kotransfektion von 293T-Zellen mit pPBjΔenv und einem Hüllprotein-Expressionskonstrukt Pseudotypvektoren hergestellt. Als Hüllproteine wurden verschiedene retrovirale Hüllproteine (von SIVsmmPBj1.9 selbst, von HIV-1, SIVagm, SNV, amphotropem und ecotropem MLV) sowie das G-Protein des VSV (Vesicular stomatitis virus, einem Rhabdovirus (*Expressionsplasmid für VSV-G*, Ory DS et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:11400). verwendet. Mit allen Hüllproteinen konnten Pseudotypvektoren hergestellt werden, die mitotische Zellen mit unterschiedlicher Effizienz transduzieren konnten. Da durch diese Vektoren der ersten Generation noch keine Fremdgene, sondern das PBjΔenv-Genom übertragen wird, wurde zur Bestimmung der Transfektionseffizienz die Expression von PBjΔenv-Genen in den Zielzellen nachgewiesen. Hierzu wurden die transduzierten Kulturen mit einem HIV-2-Serum, das mit verschiedenen SIVsmm-Proteinen kreuzreagiert, im „in situ Immunperoxidase Assay“ (IPA) angefärbt. Positive Reaktionen

bewiesen die Expression von übertragenen PBj $\Delta$ env-Genen. Am effizientesten erwiesen sich die mit VSV-G pseudotypisierten Vektoren [SIVsmmPBj(VSV-G)], die im folgenden hauptsächlich verwendet wurden. Damit wurden Titer um  $1-3 \times 10^5$  i.u./ml (infektiöse Einheiten je ml) erreicht (gemessen auf sich teilenden Zielzellen), die durch  
5 Ultrazentrifugation noch wesentlich gesteigert werden können.

## Beispiel 2

### Fähigkeit von [SIVsmmPBj(VSV-G) Pseudotypvektoren der ersten Generation zur Transduktion von G0-arretierten Zellen

10 Zur Überprüfung der Fähigkeit zur Transduktion von Zellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus wurde eine humane Zelllinie mit Standardmethoden in der gewünschten Phase arretiert. Untersucht wurden: i) nicht arretierte (sich teilende) Zellen, ii) mit Aphidicolin in G1 arretierte Zellen, iii) mit einer Kombination aus Serumentzug und Äthanol in G0 arretierte Zellen. Die korrekte Arretierung wurde durch Messung des DNA-Gehalts durch  
15 Propidiumjodid-Färbung und FACS-Analyse, sowie indirekt durch die Transduktionseffizienz von C-Typ-retroviralen und herkömmlichen lentiviralen Vektoren nachgewiesen. Als Zelllinie wurde die „GHOST CXCR4“ Linie (Owen SM et al. (1998) *J. Virol.* 72:5425), eine humane Osteosarkom-Linie, verwendet, die stabil mit den CD4- und CXCR4- Rezeptoren sowie einem TAT-abhängigen GFP-Expressionsvektor transfiziert ist. Sie wurde gewählt, da sie gut  
20 zu arretieren ist und die Genübertragung durch die GFP-Induktion durch das übertragene SIVsmmPBj-Tat-Gen nachgewiesen werden und so der serologische Nachweis von SIVsmmPBj-Genprodukten durch IPA mit einer unabhängigen Methode bestätigt werden kann.

Zum Vergleich mit herkömmlichen Vektoren wurden C-Typ-retrovirale und lentivirale  
25 Vektoren, pseudotypisiert mit dem gleichen Hüllprotein (VSV-G), durch transiente Transfektion von 293T-Zellen hergestellt: [MLV(VSV-G)] und [HIV-1(VSV-G)]. Der verwendete herkömmliche, vom Murinen Leukämievirus abgeleitete [MLV(VSV-G)]-Vektor überträgt das X-Gal-Gen, so daß die Genübertragung durch Expression dieses Markergens bestimmt werden konnte. [HIV-1(VSV-G)]-Vektoren wurden analog zu [SIVsmmPBj(VSV-  
30 G)] mit einem im Env-Gen deletierten HIV-1-Klon generiert, so daß die Genübertragung ebenfalls durch IPA und TAT-induzierte GFP-Expression gemessen wurde.

Verschieden arretierte Zellen wurden mit den 3 verschiedenen Vektortypen transduziert und die Genübertragungseffizienz (gemessen als Anteil der Zielzellen, die das übertragene Gen exprimieren) bestimmt. Die Ergebnisse waren wie folgt:

1) MLV-abgeleitete retrovirale Vektoren konnten nur sich teilende Zellen transduzieren.

2) HIV-abgeleitete lentivirale Vektoren konnten sich teilende und G1-arretierte Zellen transduzieren.

5 3) SIVsmmPBj-abgeleitete lentivirale Vektoren konnten sich teilende, in G1 und in G0 arretierte Zellen transduzieren.

Die genauen Ergebnisse sind in Tabelle 1 und der Abbildung 2 dargestellt.

	Vektor	Analysemethode	Transduktionstiter [i.U./ml]		
			Proliferierend	G1/S-Arrest	G0-Arrest
Experiment #1:	[SIV <sub>PBj</sub> (VSV)]	IPA	8,00E+05	1,40E+05	6,40E+05
	"	GFP	2,10E+05	2,40E+05	1,00E+05
	[HIV-1(VSV)]	IPA	1,80E+05	9,90E+04	6,80E+03
	"	GFP	2,80E+05	1,30E+05	7,10E+03
	[MLV(VSV)]	X-Gal	9,90E+03	0	3,75E+01
Experiment #2:	[SIV <sub>PBj</sub> (VSV)]	IPA	9,30E+05	5,50E+05	7,20E+05
	"	GFP	3,95E+05	3,40E+05	1,90E+05
	[HIV-1(VSV)]	IPA	3,10E+05	7,20E+04	2,00E+04
	"	GFP	3,00E+05	2,20E+05	4,90E+03
	[MLV(VSV)]	X-Gal	9,00E+03	5,00E+00	2,00E+02

Tab. 1: Vergleich der Effizienz verschiedener Vektoren zur Transduktion arretierter Zellen.



158-9

**Patentansprüche**

5

10

15

20

25

30

40

45

50

1. Retroviraler Vektor, der zur Transduktion von Zellen in der G0-Phase fähig ist, dadurch gekennzeichnet, dass der Vektor von SIVsmmPBj14 abgeleitet ist.
2. Retroviraler Vektor nach Anspruch 1, der ferner zur Transduktion von Zellen in der mitotischen und/oder in der G1-Phase fähig ist.
3. Retroviraler Vektor nach Anspruch 1 oder 2, wobei ein Teil oder das gesamte env-Gen von SIVsmmPBj14 deletiert ist.
4. Retroviraler Vektor nach Anspruch 3, wobei die Deletion im SU-Bereich von env vorliegt.
5. Retroviraler Vektor nach einem der Ansprüche 1 – 4, wobei der Vektor als Pseudotypvektor vorliegt.
6. Retroviraler Vektor nach einem der Ansprüche 1 – 5, umfassend einen Teil oder das gesamte Hüllprotein eines zu SIVsmmPBj14 unterschiedlichen Virus.
7. Retroviraler Vektor nach Anspruch 6, wobei das Virus aus HIV-1, SIVagm, SNV, MLV oder VSV ausgewählt ist.
8. Retroviraler Vektor nach Anspruch 6, wobei das Hüllprotein das G-Protein von VSV ist.
9. Verfahren zur Herstellung von Pseudotypvektoren, umfassend die Schritte:
  - a) Deletieren eines Teils oder des gesamten env-Gens von SIVsmmPBj14 oder eines davon abgeleiteten Moleklarklons, und
  - b) Kotransfektion von Zellen mit dem in a) erhaltenen Konstrukt und einem Expressionskonstrukt für ein Hüllprotein eines zu SIVsmmPBj14 unterschiedlichen Virus.
10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei durch die Deletion des env-Gens das env-Oberflächenhüllprotein nicht mehr funktionsfähig ist.
11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, wobei die Zellen 293T-Zellen sind.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11, wobei das Virus aus HIV-1, SIVagm, SNV, MLV oder VSV ausgewählt ist.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 – 11, wobei das Hüllprotein das G-Protein von VSV ist.

14. Pseudotypvektoren erhältlich nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 9 – 13.

5 15. Verwendung eines Vektors nach einem der Ansprüche 1 – 8 und 14 zur Transduktion von Zellen in der G0-Phase.

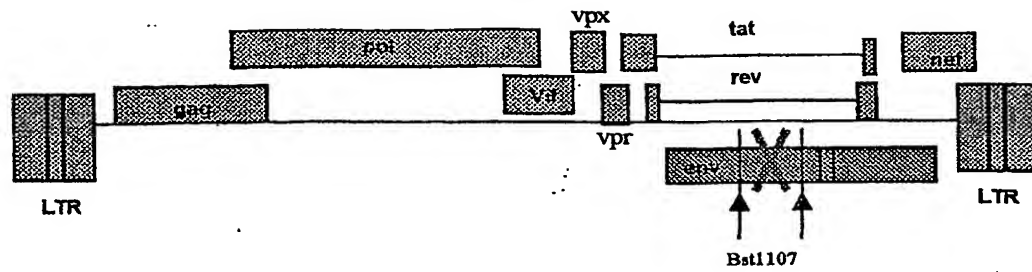
10 16. Verwendung nach Anspruch 15, wobei die Zellen Säugerzellen, insbesondere humane Lymphozyten sind.

17. Verwendung nach Anspruch 15 oder 16, wobei die Zellen in der G0-Phase aktiviert oder nicht aktiviert sind.

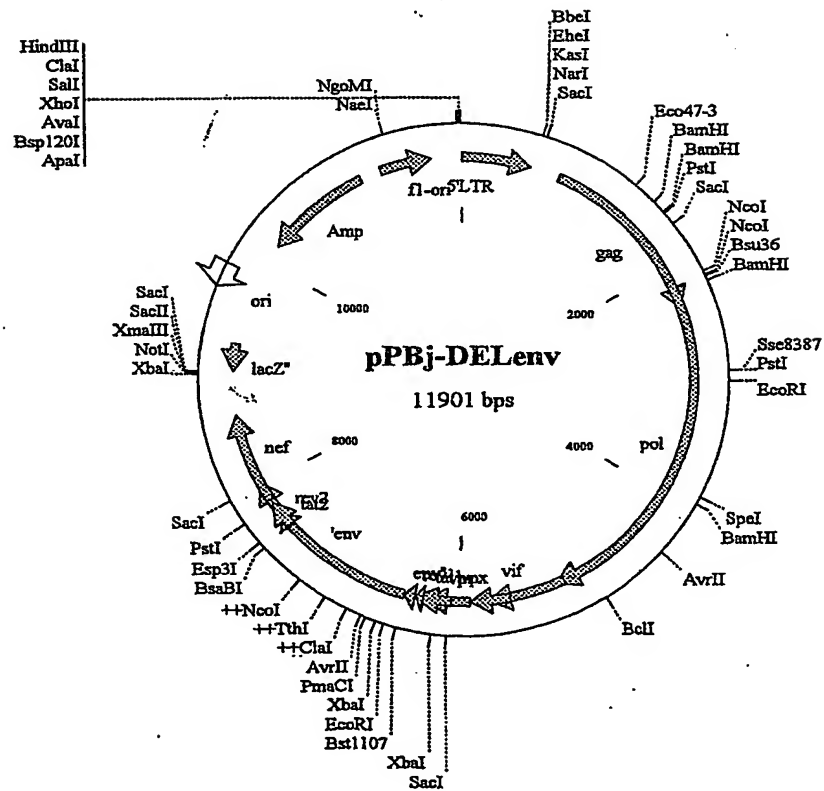
## Zusammenfassung

5 Gegenstand der Erfindung sind retrovirale Vektoren (sogenannte lentivirale Vektoren), mit welchen Gene in Zellen, die sich im Zellzyklusstadium G0 befinden, transferiert werden können, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihrer Verwendung zur Genübertragung in Säugerzellen. Diese Vektoren wurden von SIVsmmPBj14 (Simianes Immunodefizienzvirus der Schopfmangabe („sooty mangabey monkey“), Stamm Pbj14, abgeleitet.

A)



B)



C)



Abb. 1

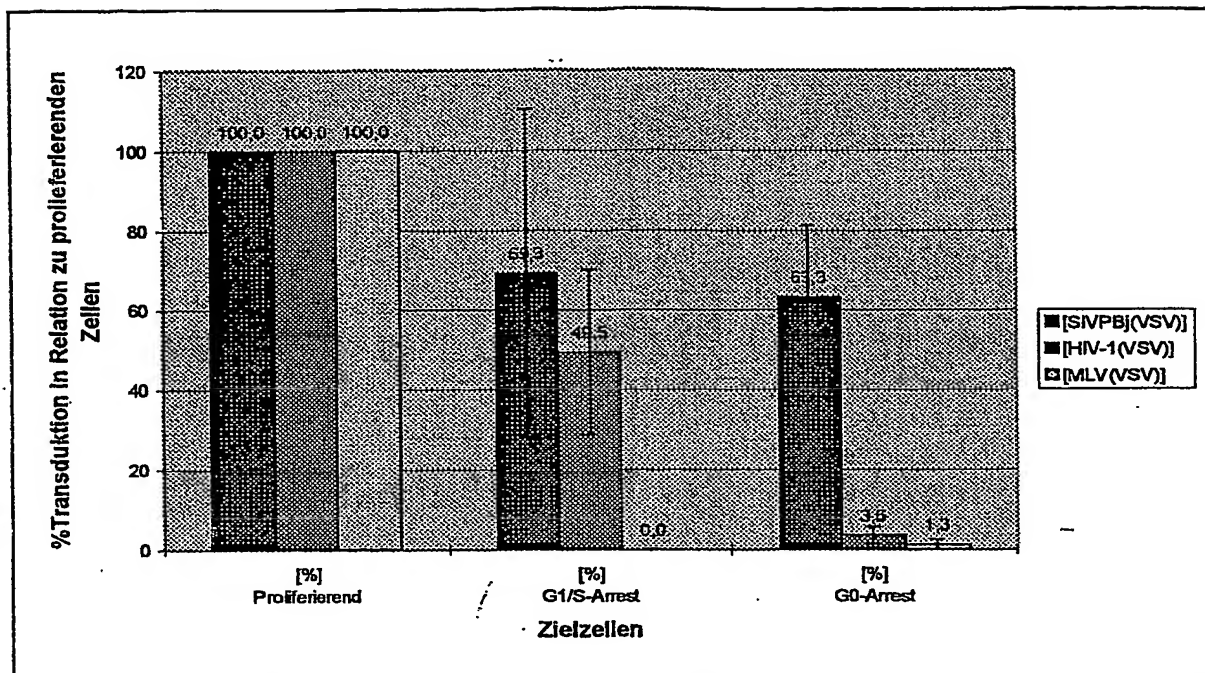


Abb. 2

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**